



No. 43 Sep. 2005

## PCR 法による動物種の鑑定 ～ 異物試験への応用 ～

はじめに

食の安全・安心への関心の高まりを背景に、食品に混入した異物が何に由来するかを明らかにする同定試験が年々増加しています。異物のうち、骨片や肉片など動物由来成分については、その原料や混入経路の推定のために動物種の鑑定結果が重要あるいは決定的な情報となる場合があります。ここでは、DNA の増幅・検出法として、現在、様々な分野で利用されている PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いた動物種鑑定の基本原理と異物試験への応用について紹介します。

動物種の鑑定方法

肉種鑑別には、形態学的(筋繊維)、免疫学的(特異抗体・抗血清)あるいは理化学的(アミノ酸・脂肪酸組成)方法など、様々な手法が従来から利用されています。しかし、これらの方法には、加熱変性を受けた検体には用いることができない、あるいは感度・特異性が十分ではないなどの問題点が残されています。

これに対して DNA(デオキシリボ核酸)を検出する方法は、DNA が熱に対して非常に安定であることに加え、動物種に特徴的な情報(DNA 配列)に富むこと、さらに PCR 法を用いることにより、高感度かつ特異的に目的の DNA 配列を検出できることから、調理加工済みの肉片や微細な骨片に対しても応用可能な方法として注目されています。

動物種に特異的な DNA 配列

生物の体はたくさんの細胞が集まってできています。細胞の中にある DNA には、遺伝のもととなる情報「生命の設計図」が書き込まれていて、親と同じ性質を子へと伝えていく役割を担っています。DNA は、構造の異なる 4 つの塩基 A(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)が一定の法則で並んだ 2 本の鎖でできています。人の場合には全 DNA は約 30 億個の塩基対からなることが知られています。この DNA 配列は生物の複製に必要な一揃いの情報(ゲノム)を含み、その中には生物全般に共通な部分も存在しますが、人、牛、豚などの動物種に特異的な領域も存在します。中でも細胞内小器官であるミトコンドリア(mitochondria)の DNA(mtDNA)の特定領域には、動物種に特異的な DNA 配列が多数存在し、これまでの研究から多くの動物種に関する情報が豊富に蓄積・公開されています。

### PCR 法による DNA 配列の検出

mtDNA の一部の DNA 配列を調べ、対照品あるいはデータベースの情報と比較することにより、動物種の同定を行うことが可能です。この DNA 配列を調べるための実際の作業は、検体からの DNA 抽出、目的 DNA 配列に対する PCR 増幅による検出、さらに詳細な DNA 配列情報を得る必要がある場合の塩基配列解析からなります。

DNA の抽出に関しては、市販の動物 DNA 抽出試薬キットを用いて、効率良く DNA を回収できます。続く PCR 増幅のステップでは、目的の DNA 配列を認識できる (A:T, G:C の水素結合に基づく) 一对のプライマー (20 個程度の塩基からなる合成 1 本鎖 DNA で検体 DNA の二本鎖に対応した組合せにより増幅範囲を規定) と耐熱性の DNA 合成酵素を用いて、温度制御 (95 60 前後 72 のサイクルを 30 ~ 40 回) を行うことにより、プライマー対で挟まれた特定領域の DNA 配列を量的に数 10 万倍に増幅・検出することが可能となります。実際の判定は、アガロースゲル電気泳動により PCR 増幅産物を長さの違いにより分離し、DNA 発蛍光試薬 (エチジウムブロマイド) の存在下、目的とする長さの蛍光バンドの有無を判定します (特異的 PCR)。

さらに詳細な解析が必要な場合には、DNA シーケンサを用いて数 100 塩基対の PCR 増幅産物全ての DNA 配列を決める塩基配列解析を行います。上述の特異的 PCR が正しく目的の DNA を増幅しているかどうかの確認、あるいは動物種に共通な部分を認識するプライマー対を用いた PCR 産物 (共通 PCR) の解析から、幅広い動物種の同定が可能となります。種類が多く個々の特異的 PCR の設定が困難な魚類については、この塩基配列解析が中心となります。

### 異物試験への応用

私共にご依頼頂いております異物試験のうち、動物由来検体は 40 ~ 50%、このうち、形態観察により筋肉あるいは骨と鑑定される検体は 5%程度で、この中からご希望により動物種の鑑定を行っています。また事前に骨であることが確認されている場合には、直接、動物種鑑定を実施することもあります。その他、現在、PCR 法による動物種の鑑定が可能な異物試験の概要を表に、典型的な解析例を図-1(骨片の特異的 PCR)及び図-2(魚水晶体の塩基配列解析)に示しました。

表-1 PCR 法による異物の動物種鑑定

異物検体	混入食品	鑑定対象動物	解析方法
肉片, 骨片, 軟骨, 毛, 爪, 水晶体	生肉, 加工食品	牛, 羊, 豚, 鶏, 馬, 魚(鮪, 鰯, 鮭, 鯛等)	特異的 PCR, 塩基配列解析

### PCR 法の限界

異物試験の場合、検体 DNA の状態とその DNA を抽出する作業は、最終結果を左右する非常に重要なポイントとなります。特に、高温による炭化や加圧下の調理加工により DNA が分解・断片化することが良く知られており、解析に足る DNA が残存しない場合には分析不能となります。

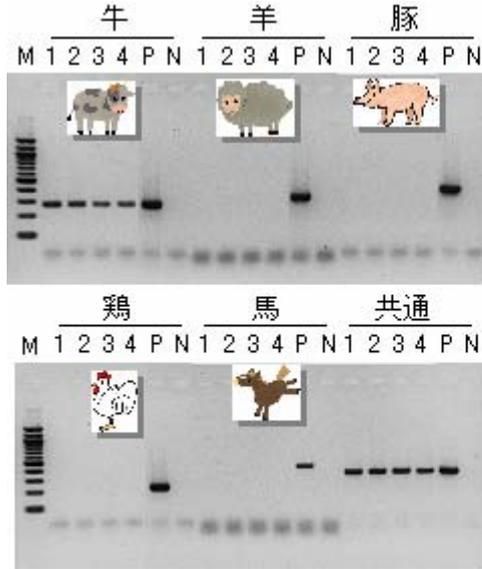


図-1 骨片の解析例

生肉から発見された骨片について、mtDNA シトクローム b 領域に対する 5 種類の各動物特異的及び共通配列を増幅する PCR (共通) を行った。その結果、牛及び共通増幅バンドを認めたことから牛由来の骨片と同定された。

M: 100bp (塩基対) サイズマーカー  
 1, 2: DNA抽出原液  
 3, 4: 原液の2倍希釈液  
 P: 陽性対照  
 N: 陰性対照

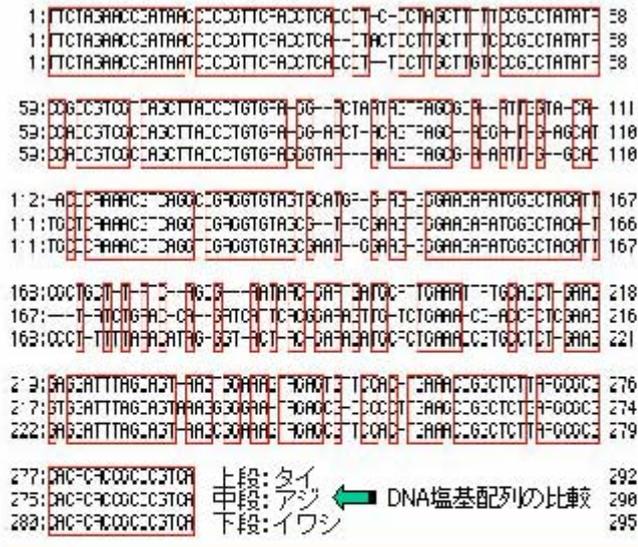


図-2 魚水晶体の解析例

3 魚種 (タイ, アジ, イワシ) の水晶体について、mtDNA 12Sリボソーム RNA 領域に対する共通 PCR を行った。その増幅産物の塩基配列解析を行い、各 DNA 配列を比較した (上)。解析により得られた DNA 配列をデータベースに照合した結果、それぞれ、マダイ、マアジ、マイワシのものとはほぼ一致した (下)。

水晶体	BLAST検索結果	同定魚種
タイ	AP002949 <i>Pagrus major</i> 100% (295/295bp)	マダイ
アジ	AB096005 <i>Trachurus trachurus</i> 100% (292/292bp)	マアジ
イワシ	AB032554 <i>Sardinops melanostictus</i> 98% (266/269bp)	マイワシ

また多くの場合は、異物が混入していた周囲環境(食品)の影響を大きく受けることとなります(汚染:コンタミネーション)。牛豚合挽のミンチ肉に鶏の骨片を埋め込んだモデル実験では、回収した骨片からは本来の鶏由来 DNA に加えて牛及び豚の DNA も検出されてきます。汚染を避けるため骨片の表面を削り取り、可能な限り内部から試料を採取しますが、肉汁中の DNA が多孔質の骨片の内部に浸透してしまうため、牛や豚の DNA が検知されるためです。この場合、PCR 条件を調整することにより、増幅バンドの強度(明瞭 vs 痕跡)からそれぞれの DNA の量比について推測が可能となり、異物の種を推定できる場合もあります。

また PCR 法による動物種鑑定の限界として、得られる情報はあくまでも DNA に基づくものなので、組織等に関する情報は全く得ることができない点があります。例えば血液や唾液由来の DNA が付着した木片について試験した場合は、動物が検知されてしまうこととなります。将来的には、組織・細胞を破壊して得られる DNA ではなく、個々の細胞内の存在状態を反映したまま DNA を検出できる FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)法や *in situ* PCR 法を適用すれば、より高度な異物の解析が可能となるかもしれません。

いずれにしても、正確な鑑定を行うためには、肉眼的な観察や他の原理に基づく方法との併用による総合的な評価が不可欠となります。

#### 今後の課題

以上のように PCR 法による異物検体の動物種鑑定については、検体自体あるいは試験法としての限界も存在するわけですが、これらの点を踏まえた上で、原材料や混入経路の特定のために、より有用な情報をご提供できるよう新しい技術の導入にも努めております。

今後の課題として、異物表層部に浸入した外来 DNA の影響の排除、甲殻類や植物成分等への解析対象の拡大について検討を加えてまいります。

#### 参考資料

- ・かずさ DNA 研究所. "DNA って何?". (オンライン),  
入手先<<http://www.kazusa.or.jp/ja2003/dna/index.html>>, (参照日 2005-8-12).
- ・NCBI. "nucleotide-nucleotide BLAST". (オンライン),  
入手先<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>>, (参照日 2005-8-12).